บทนำ

(Introduction)

การเลี้ยงสุกรของประเทศไทย ได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในปัจจุบันรูปแบบของการเลี้ยงสุกรได้เปลี่ยนรูปแบบจากการเลี้ยงสุกรหลังบ้าน มาสู่การเลี้ยงสุกรในเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งต้องใช้เงินทุน ความรู้และเทคโนโลยีต่างๆ เข้ามาประยุกต์ใช้งานเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม ผู้เลี้ยงสุกรยังคงพบกับปัญหาในเรื่องโรคระบาดต่างๆ ที่เกิดขึ้นอยู่เป็นประจำ เช่น โรคพีอาร์อาร์เอส (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) โรคอหิวาห์สุกร (Swine fever, SF) และโรคเซอร์โคไวรัส (Porcine circovirus2, PCV2) เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายค่อนข้างมากในฟาร์มสุกร และบางครั้งยังส่งผลกระทบต่อฟาร์มสุกรข้างเคียง (ในกรณีที่มีการเคลื่อนย้ายสุกรระหว่างฟาร์ม) ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการติดเชื้อ PCV2 ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย

โรคเซอร์โคไวรัส หรือ PCV2 เป็นเชื้อไวรัสอุบัติใหม่ซึ่งเพิ่งได้รับการค้นพบเมื่อไม่นานมานี้ และเป็นสาเหตุของกลุ่มอาการ post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) และกลุ่มอาการ PCV2-associated diseases (PCV-AD) อื่นๆ เช่น porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) ความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ porcine respiratory disease complex (PRDC) (Allan and Ellis, 2000; Chae, 2005) เป็นต้น ซึ่งเป็นผลจากการติดเชื้อ PCV2 ร่วมกับเชื้อโรคชนิดอื่นๆ เชื้อ PCV2 เป็นเชื้อที่ถูกจัดอยู่ในตระกูล family Circoviridae ในปัจจุบันมีการรายงานการพบ PCV 2 ชนิด ได้แก่ PCV1 และ PCV2 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันของลำดับพันธุกรรมประมาณ 68-76% โดยที่ PCV1 เป็นเชื้อไวรัสที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในสุกร และมีความสัมพันธ์กับเชื้อเซอร์โคไวรัสในพืช (Lukert et al., 1995) และมีคุณสมบัติของแอนติเจนที่แตกต่างจากเชื้อ PCV2 อย่างชัดเจน (Chae, 2004) ในขณะที่ PCV2 เป็น single-stranded DNA virus, closed circular ตัว virion มีลักษณะ icosahedral non enveloped เส้นผ่าศูนย์กลางมีขนาดเฉลี่ย 17nm (ประมาณ 15-24 nm) (Trischer et al., 1982) ถูกตรวจพบครั้งแรกในฟาร์มสุกรที่แคนาดาในปี ค.ศ.1991 โดย Harding (1996) และ Clark (1996)

ซึ่งอาการที่สามารถสังเกตเห็นได้ในลูกสุกรรายที่มีการติดเชื้อเซอร์โคไวรัสที่มีลักษณะเป็น PMWS มักพบในสุกรอายุประมาณ 6-7 สัปดาห์ จนถึงอายุประมาณ 15 สัปดาห์ สุกรจะกินอาหารลดลง น้ำหนักลด ผอม มีไข้ แสดงอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น หายใจลำบาก และอาจมีท้องเสียร่วมด้วย อัตราการตายประมาณ 20-30% ส่วนในรายที่แสดงอาการแบบ PDNS จะมีลักษณะเด่น คือ มีรอยโรคผิวหนังอักเสบเป็นตุ่มหรือขอบยกนูนขอบไม่เรียบสีม่วงแดง มักพบตามบริเวณขาหลัง โคนขาบริเวณรอบทวารหนัก ตามใบหูและใต้ท้อง ต่อมน้ำเหลืองบวมโตรวมทั้งมีไตอักเสบร่วมด้วย อัตราการตายค่อนข้างสูงในสุกรขุน

เชื้อ PCV2 ติดเข้าสู่สุกรจากการสัมผัสโดยตรง และยังสามารถติดเชื้อเข้าสู่ตัวอ่อนของลูกสุกรผ่านทางมดลูกของแม่สุกร (Ladekjaer-Mikkelsen, et al., 2001) พยาธิกำเนิดของการติดเชื้อ PCV2 ในสุกรมีความหลากหลายค่อนข้างมาก ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อไวรัส สถานะการทำงานของเนื้อเยื่อน้ำเหลือง และสถานะภาพทางภูมิคุ้มกันของสุกรในขณะที่มีการติดเชื้อ (Nauwynck, et al., 2007) เชื้อ PVC2

สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีทั้งในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองหลายชนิด และยังสามารถเพิ่มจำนวนใน peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ได้ในระยะเวลาสั้นๆ และเชื้อจะแพร่กระจายไปทั่วร่างกายของสุกร (Yu, et al., 2007) ภายหลังการติดเชื้อ PCV2 จะพบภาวะ leucopenia ได้ตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อ โดยจะพบการลดลงของ B lymphocyte และ T lymphocyte เป็นหลัก ซึ่งในสุกรที่ติดเชื้อและแสดงอาการ PMWS มักมีความผิดปกติในการสร้าง neutralizing antibody (NA) ต่อเชื้อ PCV2 ด้วย (Fort, et al., 2007) และยังอาจจะมีผลต่อการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น การศึกษาของ Darwich, et al. (2007) ที่พบว่าสุกรที่ติดเชื้อ PCV2 และแสดงอาการของ PMWS หรือ PDNS มักมีรูปแบบในการสร้าง cytokine เพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่ผิดปกติไป นอกจากนี้เชื้อ PCV2 ยังสามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง interleukin-10 (IL-10) ซึ่งเป็น cytokine ที่มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบของสุกรที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ โดยจะพบการเพิ่มสูงขึ้นของ IL-10 ในกระแสเลือดในช่วงเวลาเดียวกันกับระยะที่สามารถตรวจพบเชื้อ PCV2 ในกระแสเลือด ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงการรบกวนการทำงานหรือสมดุลของการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสุกรที่ติดเชื้อ PCV2

ในการตรวจพิสูจน์เชื้อและตรวจแยกเชื้อระหว่าง PCV1 และ PCV2 สามารถทำได้โดยใช้วิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อเซอร์โคไวรัส หรือวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) รวมทั้งการตรวจแยกเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดออกจากกันด้วยภูมิจำเพาะ (monoclonal antibodies) (Allan *et al.* 1999) มีรายงานบางการศึกษา พบว่าเชื้อ PCV2 มีลำดับของ DNA ที่มีหน้าที่ผลิตโปรตีนเฉพาะ จำนวนประมาณ 6 ท่อน (open reading frames, ORF) ท่อนที่สำคัญมี 2 ท่อน ได้แก่ ท่อนที่ 1 (ORF1) ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิตโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อเซอร์โคไวรัส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสพันธุกรรมของเชื้อเซอร์โคไวรัสทั้งสองชนิด (PCV1 และ PCV2) พบว่ามีความเหมือนกันค่อนข้างมาก และส่วนท่อนที่ 2 (ORF2) มีหน้าที่ในการผลิตโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบโครงสร้างหลักของเชื้อเซอร์โคไวรัส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสพันธุกรรมของเชื้อเซอร์โคไวรัสทั้งสองชนิดพบว่ามีความเหมือนกันน้อยกว่าในส่วนของ ORF1 (Morozov *et al.*, 1998; Nawagitgul *et al.*, 2000) จากความรู้ดังกล่าว ทำให้การพิสูจน์แยกเชื้อระหว่าง PCV1 และ PCV2 ออกจากกัน สามารถกระทำได้โดยอาศัยการตรวจด้วยวิธี PCR ในส่วนของ ORF2 ร่วมกับ ORF1 (Ouardani *et al.* 1999)

การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อเซอร์โคไวรัสในสุกร ต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานที่รวบรวมมาจากประวัติอาการสุกรป่วย รอยโรคที่เห็นด้วยตาเปล่าจากการผ่าซาก และรอยโรคในเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ ที่พบจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ และรวมถึงการเพาะแยกเชื้อเซอร์โคไวรัส นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคการตรวจวินิจฉัยโรคโดยอาศัยวิธีการตรวจในระดับโมเลกุลเพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อหรือส่วนประกอบของเชื้อเซอร์โคไวรัส เช่น การตรวจหาและเพิ่มจำนวน DNA ของเซอร์โคไวรัสจากซีรั่ม (serum) หรือชิ้นเนื้อเยื่อ (tissue) ที่มีรอยโรคด้วยวิธี PCR โดยทำการตรวจหาแอนติเจนของเซอร์โคไวรัส (โดยเฉพาะในส่วนประกอบของเชื้อที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิตอบสนองต่อเชื้อ) โดยทั่วไปตัวอย่างชิ้นเนื้อจากอวัยวะที่มีรอยโรคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อเซอร์โคไวรัส ได้แก่ ต่อมน้ำเหลืองจากบริเวณขาหนีบ หรือจากบริเวณพวงลำไส้ หรือบริเวณหลอดลม ม้าม ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ทอนซิล ปอด ตับ และไต อัตราผลการตรวจแยกเชื้อจากอวัยวะแต่ละชนิดอาจไม่

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 3 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 246838

เท่ากัน ขึ้นอยู่กับสุกรแต่ละตัว และระดับความรุนแรงของรอยโรค รวมทั้งการติดเชื้อร่วมกับเชื้ออื่นๆ เช่น เชื้อไวรัสพีอาร์อาร์เอส เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยโรคด้วยการเพาะแยกเชื้อหรือการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อจากซีรั่มสุกรที่ป่วย สามารถระบุภาวะที่มีเชื้อเซอร์โคไวรัสในกระแสเลือด (viremia) ซึ่งจากการทดลองฉีดเชื้อเซอร์โคไวรัสกับสุกร พบว่าสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อเซอร์โคไวรัสได้ตั้งแต่ประมาณ 7 วัน หลังจากการติดเชื้อ ซึ่งถือว่าการตรวจพบนี้ สามารถใช้เป็นหนึ่งในวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคในระดับเบื้องต้นได้ โดยปกติการตรวจวินิจฉัยโรคบนพื้นฐานเทคนิคของการเพิ่มปริมาณ DNA แบบลูกโซ่พอลิเมอร์เลส หรือ PCR มีขั้นตอนสำคัญที่เริ่มจาก การสกัด DNA จากตัวอย่าง การเพิ่มปริมาณ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างโดยใช้หลักการจับตัวแบบคู่สมของ DNA เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เป้าหมายเฉพาะที่สนใจ และการตรวจการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณ DNA ที่เกิดขึ้นผ่านการแยก DNA ด้วยสนามไฟฟ้า การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ (primers) และกิจกรรมของเอนไซม์ทนร้อนในการสังเคราะห์สาย DNA ชิ้นใหม่เป็นรอบๆ นี้ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้มากกว่า 6 ล้านล้านโมเลกุลของ ภายใน 30 รอบหรือภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง (การเพิ่มปริมาณ DNA จะมีการใช้อุณหภูมิในระดับที่แตกต่างกันในแต่ละรอบ) แม้เทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA แบบลูกโซ่พอลิเมอร์เลสจะได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีหลักในการตรวจการติดเชื้อ การตรวจเพื่อบอกชนิด หรือการปนเปื้อนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม ฯลฯ แต่ตัวเทคนิค PCR กลับไม่สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในภาคสนาม เนื่องจากต้องอาศัยห้องปฏิบัติการเฉพาะทาง ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญการและเครื่องมือราคาแพง และใช้เวลามากกว่า 3-5 ชั่วโมง เหล่านี้เป็นข้อจำกัดในการขยายผลไปสู่การใช้งานได้จริงในภาคสนาม

นอกจากวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA แบบ PCR แล้ว การเพิ่ม DNA ด้วยหลักการชักนำให้เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยอุณหภูมิระนาบเดียวโดยการชักนำของไพรเมอร์ให้เกิดการสังเคราะห์ DNA แบบห่วง (loop mediated isothermal amplification; LAMP) มีข้อเด่นเหนือกว่าเทคนิคของการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธีอื่นๆ และรวมถึงวิธีของ PCR โดยเฉพาะในเรื่องของการใช้อุณหภูมิระนาบเดียวที่ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่สอดคล้องกับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด DNA และในเรื่องความเฉพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ที่มีถึง 6 ไพรเมอร์ จึงทำให้มีความเฉพาะเจาะจงสูงกว่าวิธี PCR ถึงมากกว่า 1000 เท่า และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ DNA จากแหล่งที่มี DNA หลากหลายชนิดที่ปนกัน เช่น กรณีของการสกัด DNA ที่มาจากอาหาร ทำให้สัดส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาลดลงจากภาวะปกติลงมาก (จากปกติประมาณ 3 ชั่วโมง เป็น 25–40 นาที) โดยที่จำนวนโมเลกุล DNA ที่เพิ่มได้ มีปริมาณสูงกว่าวิธี PCR ไม่น้อยกว่า 1000 เท่า ทำให้เทคนิค LAMP มีประศักยภาพสูง และจากการที่ใช้อุณหภูมิที่คงที่ ที่ 60-65 องศาเซลเซียส (ที่สอดคล้องกับอุณหภูมิของการสกัด DNA) ทำให้ลดความจำเป็นในการเตรียมอุปกรณ์ที่ต้องใช้จัดการกับอุณหภูมิในระดับที่แตกต่างกัน (เช่น ในกรณีของวิธี PCR) ทำให้เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้งานในภาคสนาม สำหรับการตรวจวิเคราะห์นั้นสามารถตรวจสอบได้ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีบนหลักการทางฟิสิกส์ เช่น การตรวจดูจากความขุ่นของตะกอนสารประกอบฟอสเฟต หรือดูจากการเรืองแสงของโมเลกุลสี หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง (Notomi *et al.*, 2000, Chaumpluk *et al.*, 2006) ซึ่งจะเสริมให้การตรวจสอบภายหลังการเพิ่มปริมาณ DNA ทำได้ง่าย

สรุปความสำคัญและที่มาของปัญหา

1. ความเสียหายจากโรคเซอร์โคไวรัสในฟาร์มสุกรทั่วไป ยังคงพบได้และในบางครั้งสุกรที่ป่วย อาจไม่แสดงอาการป่วยที่ชัดเจนให้เห็น ทำให้การป้องกันและรักษาไม่สามารถทำได้อย่างทันท่วงที

2. ในการตรวจวินิจฉัยโรคเซอร์โคไวรัส ต้องอาศัยการตรวจสอบประวัติการป่วย ลักษณะอาการ การตรวจสอบทางรอยโรคจากการผ่าซาก และการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการพีซีอาร์ (PCR) ซึ่งวิธีการตรวจ PCR นั้น จำเป็นที่จะต้องเก็บตัวอย่างส่งเข้าห้องปฏิบัติการ และใช้ระยะเวลาในการดำเนินการ ถึงจะทราบผลการตรวจ (โดยปกติใช้ระยะเวลาประมาณ 3-4 วัน) ซึ่งในบางครั้งการป้องกันและแก้ไขโรคระบาดทำได้ช้า และอาจก่อให้เกิดความเสียหายมากขึ้น

3. การสังเคราะห์ DNA แบบห่วง (loop mediated isothermal amplification; LAMP) มีข้อเด่นเหนือกว่าเทคนิค PCR โดยเฉพาะในเรื่อง การใช้อุณหภูมิระนาบเดียวที่ประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส และในเรื่องความเฉพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ที่มีถึง 6 ไพรเมอร์ ที่ทำให้มีความเฉพาะเจาะจงสูงกว่าวิธี PCR ถึงมากกว่า 1000 เท่า และมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ DNA แต่เทคนิคนี้ ยังไม่มีการนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจโรคเซอร์โคไวรัสในสุกร

วัตถุประสงค์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ (DNA sensor) อย่างรวดเร็วในการตรวจหาออร์ฟทูของเซอร์โคไวรัสในสุกร ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อุณหภูมิระนาบเดียว (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) ร่วมกับการตรวจหาทางไบโอฟลูออเรสเซนต์ (Bio-fluorescent) ด้วยโมเลกุลที่จับตัวกับ DNA ที่สามารถนำไปใช้งานในภาคสนาม และรู้ผลได้ในระยะเวลาที่รวดเร็ว

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้จะมุ่งเน้นการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาออร์ฟทูของเซอร์โคไวรัสจากตัวอย่างของสุกรป่วย โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสของออร์ฟทูของเชื้อเซอร์โคไวรัสอ้างอิง จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่ให้ความจำเพาะเพื่อนำมาใช้เพิ่มปริมาณ DNA บนหลักการของ LAMP และพัฒนาเทคนิคการตรวจสัญญาณ DNA บนหลักการของ Bio-fluorescent

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้เป็นการเริ่มต้นในการพัฒนาชุดตรวจสอบดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ (DNA sensor test kit) ที่มีหลักการทำงานอยู่บนเทคโนโลยี LAMP ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ประยุกต์มาจากเทคนิค PCR ที่ใช้ปฏิบัติกันในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งชุดตรวจสอบดีเอ็นเอเซ็นเซอร์นี้ เป็นการผสานองค์ความรู้ช่วยให้สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่สามารถลดการพึ่งพาห้องปฏิบัติการ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็ว และนำไป

ประยุกต์ใช้งานในภาคสนามได้ ซึ่งเป็นการการนำเสนอเทคโนโลยีที่เป็น State of the art ที่ส่งผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเทคโนโลยีหลักที่ใช้ในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ที่มีอยู่ โดยชุดตรวจสอบดีเอ็นเอเซ็นเซอร์ที่ใช้ในการตรวจ จะเป็นการใช้เพื่อการควบคุมและป้องกันโรค ก่อนที่จะเกิดการแพร่ระบาดของโรคไปยังสุกรตัวอื่นๆในฟาร์ม ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงสุกรทราบผลการตรวจเชื้อเซอร์โคไวรัส ซึ่งสุกรที่ปลอดจากเชื้อเซอร์โคไวรัสจะสามารถนำเข้าสู่ฝูงสุกรในฟาร์มได้ เป็นการลดแหล่งแพร่กระจายเชื้อ และอาจจะนำไปสู่การควบคุมและกำจัดเชื้อเซอร์โคไวรัสออกจากฝูงสุกรได้ในอนาคต